

学校编码: 10384

密级\_\_

学 号: 22620071152347

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

玫瑰杆菌抗噬菌体感染机制及南海微生物  
群落蛋白质组学研究

Studies on phage resistance of a roseobacter and the  
microbial community proteomics in the South China Sea

黄 春 晓

指导教师姓名: 焦 念 志 教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2010 年 04 月

论文答辩时间: 2010 年 06 月

学位授予日期: 2010 年 月

2010 年 06 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于        年        月        日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年        月        日

# 目 录

摘要 .....	I
Abstract .....	III
第一章 绪论 .....	1
1.1 海洋细菌与噬菌体的相互关系概述 .....	1
1.1.1 海洋噬菌体的生存对策 .....	1
1.1.2 海洋细菌抵抗噬菌体感染机制的研究概况 .....	3
1.1.3 海洋噬菌体介导的水平基因转移及其与宿主的共同进化 .....	5
1.2.4 玫瑰杆菌及其噬菌体的研究概况 .....	6
1.2 海洋微生物群落研究的相关分子生物学技术 .....	7
1.3 蛋白质组学研究概况 .....	9
1.3.1 蛋白质组学研究的历史背景及发展趋势 .....	9
1.3.2 蛋白质组研究方法 .....	10
1.3.3 蛋白质组学技术在微生物研究中的应用 .....	14
1.4 本论文的研究思路，内容和意义 .....	14
第二章 海洋玫瑰杆菌 <i>Roseobacter denitrificans</i> OCh114 抗噬菌体感染机制研究 .....	16
摘要 .....	16
2.1 前言 .....	16
2.2 材料与方法 .....	17
2.2.1 实验所用的细菌与噬菌体及其培养条件 .....	17
2.2.2 对噬菌体感染具有抗性的 <i>R. denitrificans</i> OCh114 突变株的分离 .....	18
2.2.3 <i>R. denitrificans</i> OCh114 及其突变株(M1)的前噬菌体检测 .....	19
2.2.4 CRISPRs 的计算机分析 .....	19
2.2.5 吸附动力学分析 .....	19
2.2.6 胞内蛋白提取 .....	19

2.2.7 膜蛋白提取.....	20
2.2.8 蛋白质双向凝胶电泳.....	21
2.2.9 胶内酶切及 MALDI-TOF MS/MS 质谱分析 .....	22
<b>2.3 结果 .....</b>	<b>22</b>
2.3.1 对噬菌体感染具有抗性的突变株 M1 的分离 .....	22
2.3.2 野生型 OCh114 及突变株 M1 均无前噬菌体.....	22
2.3.3 OCh114 的基因组中不含 CRISPRs 结构 .....	23
2.3.4 M1 对噬菌体 RDJLΦ1 的吸附抑制.....	23
2.3.5 OCh114 与 M1 的蛋白质表达差异.....	23
<b>2.4 讨论 .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 小结 .....</b>	<b>29</b>
<b>第三章 南海微生物群落结构与功能对冷涡的响应研究 ....</b>	<b>30</b>
<b>摘要 .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 前言 .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 材料与方法.....</b>	<b>32</b>
3.2.1 南海中尺度冷涡及采样站位.....	32
3.2.2 样品采集.....	33
3.2.3 环境蛋白质提取.....	33
3.2.4 蛋白质双向凝胶电泳.....	33
3.2.5 蛋白质鉴定.....	34
3.2.6 环境样品 DNA 的提取 .....	34
3.2.7 16S rRNA 的 PCR 扩增 .....	35
3.2.8 DNA 的纯化及浓度检测 .....	36
3.2.9 变性梯度凝胶电泳.....	36
3.2.10 系统发育分析.....	38
<b>3.3 结果 .....</b>	<b>38</b>
3.3.1 南海冷涡的扰动作用.....	38
3.3.2 环境微生物群落蛋白图谱及鉴定结果.....	39
3.3.3 环境微生物群落组成.....	39
<b>3.4 讨论 .....</b>	<b>44</b>
<b>3.5 小结 .....</b>	<b>46</b>

第四章 结论和创新点 .....	47
4.1 结论 .....	47
4.2 创新点 .....	48
参考文献 .....	49
硕士期间完成论文情况 .....	58
致谢 .....	59

# CONTENTS

<b>Chinese Abstract .....</b>	<b>I</b>
-------------------------------	----------

<b>Abstract .....</b>	<b>III</b>
-----------------------	------------

<b>Chapter 1 Introduction .....</b>	<b>1</b>
-------------------------------------	----------

<b>1.1 Overview of the relationship between marine bacteria and phage.....</b>	<b>1</b>
--	----------

1.1.1 Life strategies of phage .....	1
--------------------------------------	---

1.1.2 Research overview of phage resistance mechanisms.....	3
---	---

1.1.3 Phage-mediated lateral gene transfer and the coevolution in host-phage systems .....	5
--	---

1.1.4 Research overview of <i>Roseobacter</i> and their phages .....	6
--	---

<b>1.2 Molecular techniques for marine microbial communities study.....</b>	<b>7</b>
---	----------

<b>1.3 Overview of proteomics research.....</b>	<b>9</b>
---	----------

1.3.1 History and current trends of proteomics research .....	9
---	---

1.3.2 Methods for research of proteomics .....	10
--	----

1.3.3 Application of proteomics technologies in microbial research.....	14
---	----

<b>1.4 Purpose, design and contents of this thesis .....</b>	<b>14</b>
--	-----------

<b>Chapter 2 Studies on the anti-phage mechanism of marine</b>	
--	--

<b><i>Roseobacter denitrificans</i> OCh114 .....</b>	<b>16</b>
--	-----------

<b>Abstract .....</b>	<b>16</b>
-----------------------	-----------

<b>2.1 Preface .....</b>	<b>16</b>
--------------------------	-----------

<b>2.2 Materials and methods.....</b>	<b>17</b>
---------------------------------------	-----------

2.2.1 Bacteria and phage used in this study and their growth conditions.....	17
--	----

2.2.2 Isolation of a phage resistant mutant of <i>R. denitrificans</i> OCh114 .....	18
---	----

2.2.3 Prophage induction in strains of <i>R. denitrificans</i> OCh114 and phage resistant mutant (M1).....	19
--	----

2.2.4 In silico analysis of CRISPRs .....	19
---	----

2.2.5 Adsorption kinetics assay.....	19
--------------------------------------	----

2.2.6 Intracellular protein extraction.....	19
---	----

2.2.7 Membrane protein extraction .....	20
2.2.8 2D-PAGE .....	21
2.2.9 In-gel digestion and MALDI-TOF MS/MS analysis .....	22
<b>2.3 Results.....</b>	<b>22</b>
2.3.1 Obtaining of the phage resistant mutant M1 of <i>R. denitrificans</i> OCh114 ...	22
2.3.2 No prophage in strains of OCh114 and phage resistant mutant (M1) .....	22
2.3.3 There is no CRISPRs in the genome of OCh114 .....	23
2.3.4 Phage RDJLΦ1 adsorption was inhibited in M1 .....	23
2.3.5 Differences in protein expression between OCh114 and M1 .....	23
<b>2.4 Discussion .....</b>	<b>26</b>
<b>2.5 Conclusion .....</b>	<b>29</b>
 <b>Charpter 3 Studies on the responses of microbial community structure and function to mesoscale eddy in the South China Sea .....</b>	 <b>30</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1 Preface .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2 Materials and methods.....</b>	<b>32</b>
3.2.1 Eddy tracking in the South China Sea .....	32
3.2.2 Sample collection.....	33
3.2.3 Protein extraction .....	33
3.2.4 2D-PAGE .....	33
3.2.5 Protein identification.....	34
3.2.6 DNA extraction .....	34
3.2.7 PCR amplification of 16S rRNA gene .....	35
3.2.8 DNA purification and the concentration detection .....	36
3.2.9 DGGE .....	36
3.2.10 Phylogenetic tree construction .....	38
<b>3.3 Results.....</b>	<b>38</b>
3.3.1 Cyclonic eddy perturbation.....	38
3.3.2 Metaproteomes of microbial communities .....	39
3.3.3 Microbial community composition.....	39



3.4 Discussion .....	44
3.5 Conclusion .....	46
<b>Chapter 4 Conclusions and innovations.....</b>	<b>47</b>
4.1 Conclusions .....	47
4.2 Innovations.....	48
<b>Reference .....</b>	<b>49</b>
<b>Papers published.....</b>	<b>58</b>
<b>Acknowledgement.....</b>	<b>59</b>

## 摘 要

海洋细菌获得某种抗噬菌体感染机制后，新陈代谢能力往往有所下降，使得它们和野生型菌株可以同时共存，从而增加了微生物群落结构的多样性。此外，海洋中普遍存在的中尺度涡旋由于对深层海水的扰动作用也影响着微生物群落结构与功能。作者采用蛋白质组学技术，对一株海洋玫瑰杆菌 *Roseobacter denitrificans* OCh114 抗噬菌体感染机制以及南海冷涡对微生物群落结构与功能的影响进行了研究。

我们利用分离自南海的一株玫瑰杆菌噬菌体 RDJLΦ1，在其强胁迫诱导下获得一株对 RDJLΦ1 感染具有抗性的 *R. denitrificans* OCh114 突变株 (M1)，进而对该突变株抵抗噬菌体感染的作用机制进行了研究。首先，逐一验证并排除了以下几种抗噬菌体感染机制发生的可能性，分别是：流产性感染、溶源现象以及基于 CRISPRs 的抗感染机制。其次，吸附动力学分析表明吸附抑制很可能是突变株 M1 抵抗噬菌体感染的关键机制。最后，利用比较蛋白质组学方法，对野生型 OCh114 与突变株 M1 的膜蛋白表达图谱进行比较分析，发现一些膜蛋白的表达量的确发生了明显变化，其中共有五个膜蛋白在 M1 中的表达量明显下调，质谱鉴定结果显示它们均在细胞中执行重要的生物学功能；另外还有一些发生了不同类型修饰作用的外膜孔蛋白以及一个 OmpA 家族主要蛋白在 M1 中的表达量明显上调。研究结果暗示几种表达量下调的膜蛋白很可能充当了 RDJLΦ1 的识别受体，它们在 M1 中表达量的减少是 M1 抵抗 RDJLΦ1 感染的关键因素。这一研究将进一步丰富人们有关海洋细菌与其噬菌体之间的相互关系等方面的知识。

跟踪南海 2007 年夏季出现的一个冷涡，我们比较了冷涡和非冷涡区域表层及叶绿素最大层中细菌多样性组成及群落代谢功能的差别。运用群落蛋白质组学方法，证实这两种环境中的微生物群落蛋白质组成具有显著差别，特别是冷涡中心表层海水中 TonB 生物高聚物运输组分系统、氮调节蛋白 P-II 等蛋白含量较丰富，据此推测冷涡扰动作用可能加速了涡旋中细菌对铁离子的吸收速率，并且此类特殊环境条件下的微生物氮代谢可能处于一种较活跃的状态。另外，在冷涡中心叶绿素最大层出现了与转运营养物质相关的免疫原蛋白，该蛋白的出现很可能

与深层海水上涌带来的大量营养盐有很大关系。我们首次研究了南海冷涡扰动作用对微生物群落功能产生的影响, 这为将来人们深入研究微生物群落对环境改变的响应提供了一定的参考价值。

**关键词:** 蛋白质组学技术; *Roseobacter denitrificans* OCh114; 抗噬菌体感染机制; 冷涡; 微生物群落

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

Obtaining resistance to phages is often accompanied by a decrease in the competitive ability of the bacterial cell, thus the trade-off between resistance and competitiveness can allow the stable coexistence of sensitive and resistant bacteria, and modify the microbial community composition. Furthermore, as a result of mesoscale eddy perturbations in the ocean, deep-water was brought up, causing a shift in the microbial community structure and function. In this paper, we applied proteomic techniques to investigate the phage resistance mechanisms of *R. denitrificans* OCh114, and the response of microbial community structure and function to a cold-core cyclonic eddy in the South China Sea.

We isolated a mutant strain (M1) of *R. denitrificans* OCh114, which is resistant to the roseophage RDJLΦ1 that infects the wild type OCh114. Here, we investigate the potential mechanisms supporting phage resistance of M1. Our results excluded the possibilities of several phage resistance mechanisms, including abortive infection, lysogeny, and the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) related mechanism. Adsorption kinetics assays revealed that adsorption inhibition might be a potential cause for the phage resistance of M1. Comparative proteomic analysis of M1 and OCh114 revealed significant changes in the membrane protein complement of these bacteria. Five membrane proteins with important biological functions were significantly down-regulated in the phage-resistant M1. Meanwhile, several outer membrane porins with different modifications and an OmpA family domain protein were markedly up-regulated. We hypothesize that the down-regulated membrane proteins in M1 may serve as the potential phage receptors, whose absence prevented the adsorption of phage RDJLΦ1 to host cells and subsequent infection. This study contributes to our knowledge about the interactions between bacteria and phages in marine system.

With the objective of evaluating the response of microbial community structure

and function to mesoscale eddy, we performed measurements of bacterial diversity and community function in a cold-core cyclonic eddy and the Southeast Asia Time-Series Study station sampled in the South China Sea in summer of 2007. Comparing the protein profiles of the four microbial communities from the surface and the chlorophyll maximum layers of the two sites, significant differences were found. Notably, in the surface water of the cyclonic eddy, the TonB system biopolymer transport component and the nitrogen regulatory protein P-II appeared, we surmised that iron supplied from the surface via eddy pumping activated bacterial uptake of iron within cyclonic eddies and the microbial nitrogen metabolism was very active in this environment. In addition, at the chlorophyll maximum layer of the cyclonic eddy, the immunogenic protein related to transporting substrates were found, it suggested that the total amount of nutrients was supplied by eddy-induced upwelling. This work constitutes the first application of metaproteomics to the study of the response of microbial communities to mesoscale eddy perturbation. As a result, it provides a new research strategy for studying environmental microbes.

**Keywords:** proteomic techniques; *Roseobacter denitrificans* OCh114; phage resistance mechanism; cold-core cyclonic eddy; microbial community

## 第一章 绪论

### 1.1 海洋细菌与噬菌体的相互关系概述

海洋噬菌体是海洋生态系统中数量最多、遗传多样性最高的物种，在控制原核生物死亡率、介导宿主水平基因转移以及调控微生物群落结构等方面具有重要作用。在漫长的生物进化过程中，噬菌体发展出多样化的生存策略以实现持续不断地最大量增殖，与此同时细菌则进化出多种抵抗噬菌体感染机制，两者之间展开了一场激烈地军备竞赛。

#### 1.1.1 海洋噬菌体的生存对策

噬菌体缺乏独立完整的代谢酶系统，必须依赖宿主的酶体系获得生命活动所需的物质和能量，因此为了最大化、持续性地利用宿主这一“生物加工厂”，噬菌体进化出多种生存方式（图 1-1）。

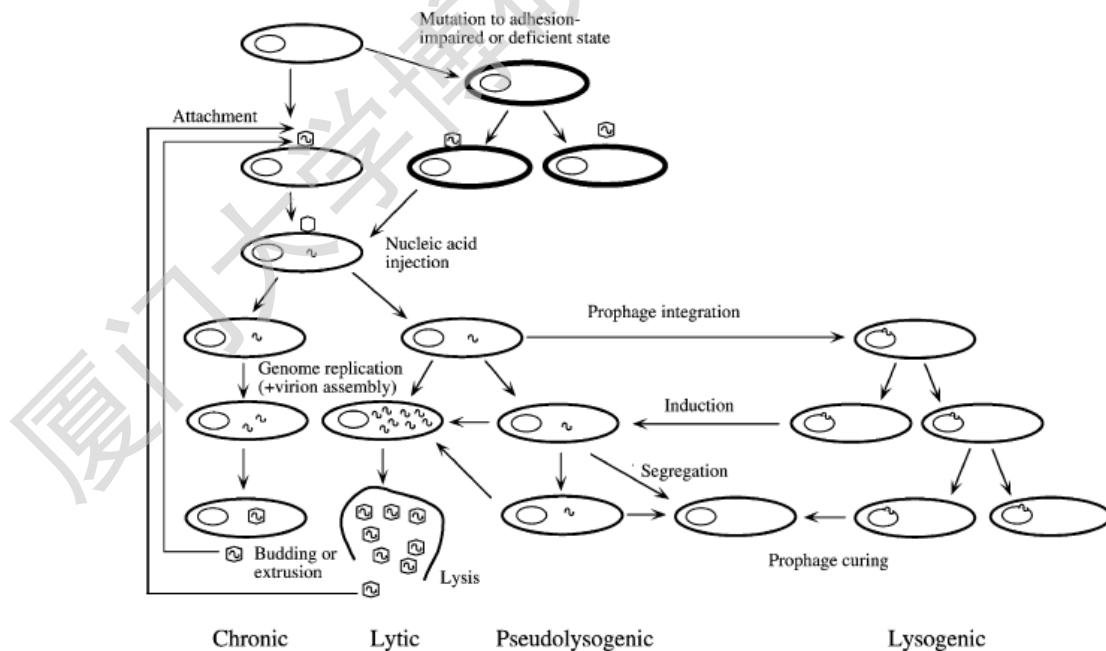


图 1-1 病毒生命循环方式（引自 Weinbauer, 2004）

Fig. 1-1 Types of viral life cycles (Weinbauer, 2004)

最典型的生存方式是裂解性方式。烈性噬菌体侵入宿主胞内后,可在短时间内快速利用宿主的酶体系进行大量增殖,并最终导致宿主细胞裂解以释放子代噬菌体。它们在海洋中大量存在,Moebus 等(1981)对大西洋海域的病毒丰度进行调查,发现烈性噬菌体在所有分离到的病毒中所占的比例高达 65%。此种方式是对富营养环境的适应(Weinbauer, 2004),富营养条件下细菌的新陈代谢和裂殖速率加快,不仅为噬菌体大量快速的繁殖后代提供了基础条件,同时也为避免细菌自身被大量裂解后所面临的绝种威胁提供了保证,使两者能够实现共同的世代延续。

溶源性方式的特点是溶源性噬菌体(也称为温和噬菌体)可将其基因组嵌入到宿主染色体中(此时称为前噬菌体),长期潜伏于宿主胞内,随宿主基因的复制而复制,并随宿主的分裂而传递到子代细菌的基因组中。前噬菌体可自发的或在理化因素(如 pH、温度、盐度、营养条件等)的诱导下脱离宿主基因组进入溶菌周期,产生并释放子代噬菌体(Sturino et al., 2006)。溶源性噬菌体在贫营养海洋环境中更具生存优势,原因在于营养物质的缺乏致使细菌丰度降低,不能满足烈性噬菌体快速大量感染的要求(Hewson et al., 2001)。另外,在较易对游离态噬菌体粒子造成威胁的海域,溶源性生存方式占据主导地位(Lenski, 1988b)。在分布上,溶源性细菌呈现出远海较近岸多的特点(Weinbauer, 1999),根本原因是远海海域受人为影响小,水体透明度大,紫外线的穿透深度随之加深,造成游离态噬菌体粒子大量死亡,因此幸存下来的噬菌体粒子选择以溶源性方式暂时“寄生”于宿主体内免受不良环境的威胁(Wilhelm, 1998)。在深海中,异养微生物群落主要由溶源性细菌组成(Weinbauer et al., 2003)。

假溶源性的存在状态在海洋生态系统中广泛分布,其特点是噬菌体核酸以类似质粒的形式独立存在于宿主胞质中。这种方式能够使噬菌体在所处微环境发生变化时有效的保护自身(Wommack, 2000)。目前有关此类生存对策的研究还没有形成统一的观点,Ripp 等人(1998)认为假溶源性是由于宿主处于高度饥饿的状态时,噬菌体缺少足够的能量用于启动基因表达进入溶源性或烈性状态,因而出现的一个噬菌体与宿主共存的特殊阶段。Moebus(1996)则认为假溶源性是一个短暂的细菌表现免疫性状态的阶段,随着诱导因子(可能是一种多糖解聚酶)的出现而结束。

慢性感染方式最大的特点是噬菌体不会造成细菌裂解,子代噬菌体通过分泌或出芽的方式进行释放。在有关水域生态系统的研究中,目前只有 Hofer 等人 (2001) 在位于奥地利阿尔卑斯山脉上的 Gossenköllesee 贫营养高山湖中,发现了一种纤维状噬菌体以慢性感染的方式寄生于宿主细菌胞内。有关此种方式的生态学意义以及噬菌体在何种环境条件下会采用这种生存方式尚不够清楚。

噬菌体通过控制在宿主胞内的潜伏期长短,实现最大化增殖,其中宿主的丰度和生理状态是实现这一调控的间接决定因素 (Abdon et al., 2001)。在细菌数量多、活性高的情况下,噬菌体大多采取缩短潜伏期的对策——裂解性方式 (Weinbauer, 2003),快速释放子代噬菌体,增大世代循环数;相反,细菌数量极少时,噬菌体则采取延长潜伏期的对策——溶源性方式,以求在渡过不良环境的同时,保证子代噬菌体的最大释放量 (Abdon, 1989)。

### 1.1.2 海洋细菌抵抗噬菌体感染机制的研究概况

在高达每秒  $10^{23}$  的感染压力下 (Suttle, 2007),海洋细菌进化出一系列有效的可遗传的抗噬菌体感染机制。目前已发现五大抗感染机制,分别是吸附抑制、噬菌体 DNA 注入阻挠、限制/修饰系统、流产性感染以及规律成簇的间隔短回文重复防御体系,其中前四个机制是分别针对噬菌体完成世代循环所必不可少的几个关键步骤(如吸附、脱壳、生物合成、组装)加以阻断(图 1-2)。每种抗感染机制以连续或并列的方式发挥作用。

吸附抑制是阻碍噬菌体感染的第一道防线。吸附的实现需要借助细胞表面受体,即噬菌体的吸附蛋白只有在特异性识别细菌细胞表面受体后,才能将其尾部或衣壳附着在细菌表面。细菌的细胞表面受体大多数是位于细胞壁上的磷壁酸分子、脂多糖分子或糖蛋白复合物,也有的位于菌毛、鞭毛或荚膜上。细菌通过调控受体基因表达、改变受体蛋白空间构型或对受体进行修饰,使噬菌体无法识别吸附位点,从而阻止吸附。

通常噬菌体吸附到细菌表面之后,随即进行 DNA 注入及脱壳。有尾噬菌体常常采取注射式侵入的方式,通过尾部收缩将 DNA 注入到宿主细胞内。Monteville 等人 (1994) 发现  $30^{\circ}\text{C}$  时噬菌体 DNA 注入的速度极快,而在  $4^{\circ}\text{C}$  的条件下不能完成 DNA 注入,说明噬菌体能否顺利完成 DNA 注入与细菌细胞膜的流动性具有密切关系。后来 Weinbauer (2004) 证实细菌还可通过改变其细胞外



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库